

Project: Methode voor het aantonen en bepalen van conserveermiddelen en desinfectiemiddelen.


Onderwerp: De bepaling van natamycine in kaas op residu-niveau m.b.v. HPLC.

Doel:

Ontwikkelen en testen van een snelle methode voor de bepaling van natamycine in kaas op lage niveau's.

Samenvatting en conclusie:

Een vroeger ontwikkelde en ook gevoelige HPLC methode bleek niet zo goed reproduceerbaar te zijn. Door een methanol extract van de kaas aan koeling met vloeibare stikstof te onderwerpen werd een gezuiverd extract verkregen dat na verdere concentratie, centrifugering en filtratie zonder problemen geïnjecteerd kon worden op het HPLC systeem. Detectiegrens ligt beneden de 0,05 mg/kg kaas. Recoveries zijn ca 100%. Deze methode is vooral ontworpen om de doordringing van de natamycine in de kaas te bepalen.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra 

Medewerkers/samenstellers: W.A. Traag; G. v. Bruchem.

L.G.M.Th. Tuinstra,

W.A. Traag,

G. van Bruchem.

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten

Inleiding

Natamycine (pymaricine) is een antibioticum tegen schimmels. Het wordt gebruikt in de geneeskunde, in kleine mate in de diergeneeskunde, maar de laatste jaren ook als schimmelwerend middel in kaas- en worstsoorten. Ook zijn er voorstellen tot gebruik en toepassingen bij hammen, wijnen (1) e.d.

Doordat de vorming van schimmels wordt tegengegaan is de kans op mycotoxine produktie verlaagd, terwijl het uiterlijk van de kaas daardoor verbeterd wordt. Bovendien wordt de smaak van het produkt niet aangetast. Vooral wat dit laatste betreft hebben andere conserveermiddelen (sorbinezuur) niet helemaal aan de verwachtingen voldaan (2). In Nederland is het gebruik van natamycine op kaas toegestaan.

Binnen de EEG is een rapport van het wetenschappelijk comité voor de menselijke voeding over natamycine uitgebracht (oktober 1979) met daarin o.a. de eis dat het residu van natamycine in kaas per vierkante decimeter niet meer dan 1 mg mag bedragen, en dat natamycine op een diepte beneden de 5 mm niet meer aantoonbaar mag zijn.

Men mag verwachten dat de natamycineconcentratie in de kaas afneemt met toenemende afstand tot de kaaskorst, tenminste wanneer de natamycine op de buitenkant van de kaas is aangebracht. Dit gegeven en een tolerantie uitgedrukt in mg per oppervlakte eenheid brengt toch wel enkele problemen met zich mee.

De detectiegrens van de analyse wordt beïnvloed door de hoeveelheid in bewerking genomen monster, door de absolute gevoeligheid van het detectiesysteem en door de invloed van de matrix op de absolute gevoeligheid. De twee laatste factoren beïnvloeden de signaal/ruis verhouding.

De tolerantie in mg/dm^2 zou in eerste instantie uitnodigen tot het analyseren, bij een gegeven kaas oppervlak, van een dikke kaasplak om alle, eventueel aanwezige natamycine te extraheren en te bepalen. Echter hoe dikker de in bewerking genomen kaaslaag, hoe lager de relatieve bijdrage aan natamycine resp. hoe hoger de relatieve bijdrage aan matrix effecten. Alleen in het geval men matrix storingen volledig zou kunnen uitschakelen speelt de dikte van de kaasplak geen rol. In het geval men vanaf een bepaalde afstand onder de kaaskorst geen natamycine meer mag aantonen is het zaak op die afstand een zo dun mogelijke laag te verzamelen met een zeer groot oppervlak.

Deze twee manieren van aanpak zullen resulteren in een detectiegrens die onderling behoorlijk afwijkend kunnen zijn, ongeacht of men de grens uitdrukt in mg/dm^2 of mg/kg kaas.

Als we het soortelijk gewicht van kaas op $1,1 \text{ g/cm}^3$ stellen kan de detectiegrens in mg/kg kaas makkelijk naar mg/dm^2 kaas omgerekend worden, door het gehalte in mg/kg te vermenigvuldigen met: $1,1 \cdot 10^{-2}$, waarin d de kaasplakdikte in mm is.

Door Frede (3) worden een aantal analyse mogelijkheden voor natamycine in kaas aangegeven. De statische spectroscopische U.V.-methode zou zonder matrix storingen een detectiegrens in de orde van $0,01 \text{ mg/dm}^2$ bereiken bij een laagdikte van 2 - 3 mm . Als deze als screening bedoelde U.V.-methode een verdacht monster zou signaleren dan zou een chromatografische techniek nodig zijn voor confirmatie en quantificatie. Om met HPLC een zelfde detectiegrens te bereiken moest Frede zijn oorspronkelijk extract ten minste 10x concentreren. De dan door Frede met HPLC gerealiseerde detectiegrens (naar kaas omgerekend ca. $0,5 \text{ mg/kg}$ kaas) is o.i. niet voldoende om de afwezigheid in een bepaald deel der kaas aan te tonen (EEG eis). M.a.w. de concentrering zou veel groter moeten zijn.

Echter een enkel experiment, conform het voorschrift van Frede, maakt duidelijk dat een zuiveringstap noodzakelijk zou zijn om matrix storingen te verwijderen en zo het gewenste doel nl. een detectiegrens lager dan $0,1 \text{ mg/kg}$, te bereiken.

Experimenten

Allereerst werd getracht de HPLC bepaling met alleen natamycine na te werken op een Nucleosil 10 RP 18 kolom. Echter natamycine was in het systeem methanol-water niet van deze kolom te elueren. Op een Lichrosorb 10 RP 8 kolom daarentegen (3) werd een goede retentie verkregen met als eluens methanol-water (60-40), echter de piek vertoonde nogal staartvorming. Door toevoeging van 5% ijsazijn (4) werd een symmetrische piek verkregen.

Om een lage detectiegrens onder de 1 mg/kg kaas te bereiken moest het extrakt gezuiverd worden. Een in de zuivel bekende procedure is het klaren met Carrez I en II oplossingen, waardoor eiwitten verwijderd kunnen worden uit het methanolisch extract (5). Na enkele experimenten werd tot onderstaande methode besloten.

Snij het kaasmonster fijn. Breng 20 gram van het monster (het hiermee overeenkomend kaasoppervlak moet bekend zijn) in een hoog bekerglas van 300 ml. Voeg toe 10 ml water en na 15 minuten 40 ml methanol. Macereer dit mengsel gedurende 2 à 3 minuten met een Ultra-Turrax. Voeg achtereenvolgens 1 ml Carrez I en 1 ml Carrez II oplossing toe, schud krachtig en verdun na ca. 30 min. met 40 ml methanol, waarna het mengsel gecentrifugeerd wordt bij 3000 toeren per minuut. Filtreer de bovenstaande vloeistoflaag af en concentreer hiervan 25 ml aan de roterende vacuumverdamper bij een temperatuur van 40°C tot een volume kleiner dan 5 ml. Vul dit aan tot 5,0 ml met methanol en centrifugeer gedurende 10 min. Van de bovenstaande vloeistof wordt een aliquot gefiltreerd d.m.v. een 2 µm filter (millipore) waarna 40 µl van het heldere extract geïnjecteerd wordt in de vloeistofchromatograaf.

De recoveries waren tijdens de eerste experimenten goed (> 80%). De detectiegrens lag in de orde van 0,2 mg/kg kaas. Er werd eenmaal meegedaan aan een vergelijkend onderzoek van gemalen gemengde kaaskorst (6) waarbij de analysemethode zelf gekozen kon worden. Op het 20 mg/kg niveau werden overeenstemmende resultaten verkregen t.o.v. de spectroscopische U.V.-methode. Op het niveau van ca 150 mg/kg werden met de HPLC methode duidelijk hogere waarden gevonden.

Echter toen op een gegeven ogenblik nagegaan moest worden op welke manier natamycine fabrieksmatig het beste op de kaas aangebracht kon worden (7) en er monsters seriematig geanalyseerd moesten worden bleek toch dat de recovery van aan kaas toegevoegde natamycine grote spreiding vertoonde. Anderzijds werden zowel de HPLC als de statische U.V.-methode intern onderling vergeleken door fabrieksmatig met natamycine behandelde kaas met beide methoden te onderzoeken. Deze metingen werden uitgevoerd op niveaus tussen 10 en 50 mg/kg. Over het algemeen waren de HPLC resultaten hoger, m.a.w. met praktijkmonsters waren blijkbaar geen problemen met een slechte recovery.

Een ander idee (8) was het methanol extract te koelen bijvoorbeeld in de diepvriezer, waarbij inderdaad een neerslag ontstaat dat door centrifugeren en filtratie te verwijderen is. Aangezien wij de beschikking hadden over vloeibare stikstof werd dit gebruikt om het extract drastisch te koelen tot bevroren toe.

Een uitvoerige beschrijving is in bijgaand voorschrift gegeven. Deze methode is (o.a. door de beschikbaarheid van vloeibare N₂) sneller dan de methode met Carrez klaring.

Om een indruk te krijgen over de herhaalbaarheid van de methode werden enkele kazen gebruikt die met natamycine behandeld waren. Voldoende kaaskorst materiaal werd verzameld en door langdurig malen gehomogeniseerd om op twee besmettingsniveau's metingen te verrichten en wel op het 10 mg/kg en ca. 0,5 mg/kg niveau (zie ook fig. 1).

In tabel I staan de resultaten vermeld.

Met deze methoden zijn ook enkele (n=10) recovery experimenten in de tijd uitgevoerd door aan fabrieksmatig behandelde kaas 1 mg/kg toe te voegen. Gemiddeld recovery 107%, standaarddeviatie 4,6%. Ofschoon het aantal experimenten nog beperkt is in een korte tijd uitgevoerd werd. Anderzijds is het met deze gevoelige methode mogelijk de afwezigheid van natamycine plausibel te maken van af ca. 0,05 mg/kg.

Tabel 1.

Reproduceerbaarheid van het natamycine gehalte in kaas op het 10 mg/kg en het 0,5 mg/kg niveau.

Gehalte aan natamycine in mg/kg niveau ca. 10 mg/kg		gehalte aan natamycine in mg/kg niveau 0,5 mg/kg
	10,7	0,37
	11,8	0,29
	11,9	0,36
	11,3	0,35
	11,0	0,32
	12,2	0,39
	10,9	0,30
	10,1	0,34
	9,9	0,38
	10,8	0,37
gemiddeld gehalte	11,1 mg/kg	0,35 mg/kg
variatie coefficient	7 %	11 %

Literatuur:

1. R. de Jong, F.J.F. Bruin. Ware (n) Chemikus 9 (1979).
2. Joint Report. Investigations on the behaviour of cheese coatings containing sorbates and natamycine.
W.G. de Ruig - G. van den Berg Dec. 1979.
3. W. Frede. Milchwissenschaft 32 (1977) 66-67.
4. H.S. Tan. Gist Brocades Delft. Persoonlijke mededeling.
5. Carrez. Annale de Chimie Analytique 14 (1909) 187.
6. Ringtest "Vergelijkend onderzoek 1979".
J. Leenheer, Zuivel Controle Instituut, Leusden.
7. G. van den Berg; W.G. de Ruig: nog te publiceren in Nederlands Melk- en Zuiveltijdschrift.
8. J. Leenheer. Zuivel Controle Instituut Leusden.
Persoonlijke mededeling.

Fig. 1 Extrakt van fabrieksmatig besmette kaas, natamycine gehalte 0,3 mg/kg.

